

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07469

研究課題名(和文) 糞線虫感染によるメモリー様 ILC2 誘導機序の解明

研究課題名(英文) Memory-like ILC2 induction in *Strongyloides venezuelensis* infected mice

研究代表者

安田 好文 (Yasuda, Koubun)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：50333539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000 円

研究成果の概要(和文)：糞線虫感染後の寄生虫種非特異的な感染抵抗性(訓練免疫)にIL-33によるILC2活性化が必須である。同様にILC2を活性化するTSLPの糞線虫感染抵抗性における役割を検討したところ、TSLPは感染初期の抵抗性にCD4陽性T細胞非依存性にも関与することがわかった。TSLPの訓練免疫における影響を検討したところ、TSLPRKO/C57BL/6マウスでは訓練効果を示さなかった。IL-33誘導に関わるRBBP9欠損マウス、IL-13欠損マウスでも同様に訓練効果はみられなかった。以上より、訓練免疫に重要なメモリーILC2誘導にTSLPとIL-33の発現誘導が重要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ILC2は感染免疫に貢献する一方でアレルギーなどの炎症性疾患でも増悪因子として働く。メモリー様ILC2は慢性アレルギー性疾患で関与すると考えられ、その誘導機序の解明は慢性アレルギー疾患の病態解明に重要である。本研究ではTSLPやRBBP9、IL-13などの因子が寄生虫感染による訓練免疫獲得に必須であることを見出したが、これらの因子はメモリー様ILC2誘導を介して慢性アレルギー疾患でも増悪に関与すると考えられ、新たなアレルギー性疾患御治療戦略の新たな標的となり得る。

研究成果の概要(英文)：ILC2 activation by IL-33 is essential for parasite species-nonspecific resistance to infection (trained immunity) after *Strongyloides venezuelensis* infection. We investigated the role of TSLP, which also activates ILC2, in protection against nematode infection and found that TSLP is also involved in CD4 T cell-independent protection in the early stages of infection. Similarly, no training effect was observed in RBBP9-deficient and IL-13-deficient mice, which are involved in IL-33 induction. These results suggest that induction of TSLP and IL-33 expression is important for memory ILC2 induction, which is critical for training immunity.

研究分野：寄生虫免疫

キーワード：訓練免疫 寄生虫感染防御 IL-33 TSLP

## 1. 研究開始当初の背景

寄生虫感染症は先進国では一般的ではないが、世界保健機関の調査によると熱帯および亜熱帯地域では今なお数十億人が消化管内寄生虫に感染していると報告されており、「Neglected tropical disease」として医学上の重要な課題である。

寄生虫に対する宿主免疫応答には T 細胞を中心とした獲得免疫が不可欠である。通常、原虫感染に対して Th1 型免疫応答が誘導され、蠕虫感染には Th2 型免疫応答が誘導される。Th2 細胞は種々の Th2 サイトカインを産生することにより、蠕虫を傷害、排除する。これらの免疫応答は記憶され、再感染時には迅速に強力に働いて感染を排除する。

一方で、蠕虫感染に対しては自然免疫も働くことが明らかとなっている。蠕虫は宿主に感染し体内を移動する際にさまざまな組織の上皮および内皮細胞を損傷するが、これらの損傷により、Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)、interleukin (IL)-25、IL-33 などのサイトカインが産生される。これらの上皮由来サイトカインは Th2 細胞の誘導と同時にグループ 2 自然リンパ球 (ILC2) を活性化し、大量の Th2 サイトカインの産生を誘導する。Th2 細胞の誘導と活性化には時間を要するため、ILC2 は感染初期の Th2 サイトカインの供給源として重要である。

申請者は糞線虫 (*Strongyloides venezuelensis*) 感染に対する自然免疫にも免疫記憶があることを見出した。 *S. venezuelensis* 感染を経験したマウスは、別の寄生虫 *Nippostrongylus brasiliensis* による感染にも CD4<sup>+</sup>T 細胞非依存性、ILC2 依存性に耐性を示した (Yasuda et al. *Front. Immunol.*, 2018)。自然免疫細胞である natural killer (NK) 細胞やマクロファージにもメモリーあるいは ‘trained (訓練)’ と呼ばれる状態があり、ナイーブ細胞とは反応性が異なるが、ILC2 もメモリー様細胞に分化する。 *S. venezuelensis* 感染経験マウスの肺 ILC2 は、 *N. brasiliensis* 感染に対して迅速に強いサイトカイン産生を示すことからメモリー様 ILC2 となっていると考えられた。しかし、メモリー様 ILC2 についてはどのように誘導されるのか、また表面マーカーなど特性が未だほとんど分かっておらず、詳細な解析が必要である。ILC2 の活性化には IL-33 が必須であるが、我々の実験では、IL-33 だけではメモリー様 ILC2 を誘導できなかった。したがって、メモリー様 ILC2 分化の誘導には IL-33 に加えて IL-25、TSLP などのサイトカインの役割をさらに検討する必要がある。また、申請者はメモリー様 ILC2 が転写因子 Interferon regulatory factor (IRF) 4 をナイーブ ILC2 よりも高く発現することを見出しているが、その役割は不明である。メモリー様 ILC2 の分化には線虫感染によってもたらされる肺環境が重要であり、特に IL-33 や IL-25 などの上皮由来サイトカイン、肺の環境を形成する細胞、寄生虫由来成分によって ILC2 が刺激されることでメモリー様の細胞になると考えられる。

## 2. 研究の目的

### (1) 糞線虫感染防御における TSLP、IL-25 の役割の解析

メモリー様 ILC2 の誘導には糞線虫感染後のサイトカイン環境が重要であることが考えられる。IL-33 に加えて、TSLP や IL-25 が ILC2 を活性化することが知られているが、糞線虫感染時に実際に生体防御に関与するかは明らかではない。そこで、まず TSLPR 欠損マウス、IL-25R 欠損マウスを用いて糞線虫感染時の TSLP、IL-25 の役割を解析する。

### (2) メモリー様 ILC2 誘導における TSLP、IL-33 誘導因子の役割の解析

TSLP が糞線虫感染経験マウスでみられるメモリー様 ILC2 の分化に影響するか検討する。また、IL-33 誘導因子である RBBP9 (Adachi et al. *Int. Immunol.* 2020) を発見したので、この因子ならびに IL-33 発現を誘導することが知られている IL-13 の欠損マウスを用いて IL-33 の新規発現誘導が糞線虫感染による訓練免疫およびメモリー様 ILC2 誘導に必要であるか検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 糞線虫感染防御における TSLP、IL-25 の役割の解析

- (ア) TSLPR 欠損マウス、IL-25R 欠損マウスに *S. venezuelensis* を感染させ、糞便中の虫卵数、腸内虫体数、抗体産生、肥満細胞誘導、Th2 細胞分化について検討した。
- (イ) TSLP や IL-25 のような上皮由来サイトカインが *S. venezuelensis* 感染後、いつ、どの臓器で発現するか調べた。
- (ウ) TSLP は獲得免疫細胞にも作用することが知られているため、糞線虫排除に特に重要な CD4<sup>+</sup>T 細胞を除去し、CD4<sup>+</sup>T 細胞不在下での宿主防御反応の違いを野生型ならびに TSLPR 欠損マウスで検討した。
- (エ) TSLP による *S. venezuelensis* 感染抵抗性が肺までに起こるのか、腸管到達後に発揮されるのかを検討するため、肺ステージの *S. venezuelensis* 幼虫を回収し、野生型および TSLPR 欠損マウスに経口投与し、生着する虫体数を比較した。

## (2) メモリー様 ILC2 誘導における TSLP、IL-33 誘導因子の役割の解析

- (ア) TSLPR、RBBP9、IL-13 の各遺伝子欠損マウスに *S. venezuelensis*、*N. brasiliensis* を連続感染させ、*S. venezuelensis* 感染による *N. brasiliensis* 感染抵抗性（訓練免疫）を獲得できるか検討した。
- (イ) 野生型ならびに RBBP9 欠損マウスに *S. venezuelensis* を感染させ、経時的に BALF と肺 RNA を採取し、炎症細胞浸潤や炎症性サイトカイン等の発現を検討した。

## 4. 研究成果

### *S. venezuelensis* 感染防御に対する TSLP、IL-25 の役割

これまでの研究で糞線虫 (*S. venezuelensis*) 感染後のマウスの寄生虫種非特異的な感染抵抗性に IL-33 が ILC2 活性化を介して作用することを明らかにしてきたが、*S. venezuelensis* 感染抵抗性における TSLP、IL-25 の役割は不明であった。そこで、TSLPR 欠損マウス、IL-25R 欠損マウスを用いて、糞線虫感染に対する生体防御における TSLP、IL-25 の役割を検討した。その結果、*S. venezuelensis* 感染に対して TSLPR 欠損マウスは腸管に寄生する成虫数が増加し、また糞便 1g 中の虫卵数も増加していた。IL-25R 欠損マウスでも虫卵数が増加していたが、TSLPR 欠損マウスに比べその影響は軽微であった。TSLPR 欠損マウスでも排虫の時期は大きく変わらなかったことから、TSLP は感染初期の抵抗性に関与することがわかった。

### 上皮由来サイトカインの発現

*S. venezuelensis* 感染後、経時的に皮膚、肺、腸での各種上皮由来サイトカインの発現を調べたところ、TSLP は感染幼虫が存在する時期に皮膚、肺、腸のいずれの臓器でも一過性に発現が上昇していた。それに対し、IL-33 は皮膚、肺で増加が見られ、特に肺で強く、持続的に発現していた。IL-25 は皮膚や肺では大きな変化は認められず、腸管でやや増加する傾向を示した。mRNA の発現からは TSLP は特定の部位で作用するよりも様々な場所で線虫の影響を周囲に発信していると考えられた。

### TSLP は CD4<sup>+</sup>T 細胞依存性、非依存性の両方のメカニズムで糞線虫感染防御に貢献する

TSLPR 欠損マウスでは、野生型マウスと比較して初期の Th2 分化が抑制されており、腸管粘膜型肥満細胞の集積も著しく減少した。このことから TSLP による DC2 分化と初期の T 細胞活性化が不十分のため抵抗性低下を引き起こされたと考えられたが、CD4 陽性 T 細胞を除去しても TSLPR 欠損マウスと野生型マウスの差はなくならなかったことから、TSLP は CD4<sup>+</sup>T 細胞の活性化のみならず、自然免疫系に作用して *S. venezuelensis* 感染を抑制することを明らかにした。

### TSLP は非 CD4<sup>+</sup>T 細胞以外の Rag2 依存性リンパ球に作用して *S. venezuelensis* 感染を防御する

また TSLP は CD4 非依存性に感染抵抗性に寄与することから TSLPR/Rag2 重欠損マウスを用いて糞線虫感染実験を行ったが、Rag2 欠損マウスと比較して有意な差は認められなかった。このことから TSLP の標的細胞は NKT や T 細胞などの非 CD4<sup>+</sup>T 細胞である可能性が考えられた。

### TSLP は腸管での免疫応答に関して *S. venezuelensis* 抵抗性に影響するのではない

TSLP による糞線虫感染抵抗性が腸での生体防御反応によるものかを調べるために肺ステージ幼虫を野生型マウスより採取し、非感染の野生型あるいは TSLPR 欠損マウスに移入したところ、TSLPR の欠損による影響は見られなかった。このことから TSLP は線虫が腸に至る以前の肺などの臓器で抗寄生虫免疫応答を惹起していると考えられる。

### 訓練免疫誘導における TSLP の影響

糞線虫感染 1 ヶ月後の野生型ならびに TSLPR 欠損マウス (BALB/c バックグラウンド) に *N. brasiliensis* を感染させ、メモリー様 ILC2 の作用を検討した結果、*N. brasiliensis* 感染に対する抵抗性には差が認められなかった。ただし、肺の ILC2 数は減少しており、ILC2 数の制御に TSLP が関与する可能性があることがわかった。BALB/c マウスは Th2 細胞による 2 型免疫応答が強く現れてしまうため、C57BL/6 バックグラウンドの TSLPR 欠損マウスで改めて *S. venezuelensis*/*N. brasiliensis* 連続感染実験を行ったところ、TSLPR 欠損マウス (C57BL/6) では *S. venezuelensis* 感染による抵抗性の増強が見られず、TSLP も糞線虫感染後の鉤虫感染抵抗性に関与することを見出した。このことから C57BL/6 バックグラウンドでは訓練免疫誘導に TSLP が関与することが考えられた。

### 訓練免疫誘導における IL-33 誘導因子の役割

ILC2 活性化に必須の IL-33 の制御に関わる RBBP9 の欠損マウス (C57BL/6 バックグラウンド) を用いて糞線虫 / 線虫連続感染実験を行なったところ、RBBP9 欠損マウスでは糞線虫感染による鉤虫感染抵抗性増強作用が認められなかった。つまり、RBBP9 による IL-33 発現誘導がメモリー様 ILC2 の誘導に必要であることが考えられた。同様の結果は IL-13 欠損マウスでも認められた。そこで、RBBP9 が ILC2 の増殖、分化にどのように影響するかを調べるために野生型および RBBP9 欠損マウスに *S. venezuelensis* を感染させ、経時的に肺の炎症細胞浸潤を調べたところ、RBBP9

欠損マウスでは感染 7 - 14 日後の肺の ILC2 数が少ないことを見出した。RBBP9 と IL-13 はともに IL-33 の誘導に関わることから、感染によって遊離、産生された RBBP9 や IL-13 が IL-33 の発現を増加させることが ILC2 のメモリー化に重要であることが考えられた。以上より TSLP が糞線虫感染初期の免疫応答と訓練 (trained) 免疫の両方に関与すること、RBBP9 や IL-13 が訓練免疫誘導に必要であることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Imai Yasutomo, Kusakabe Minori, Nagai Makoto, Yasuda Koubun, Yamanishi Kiyofumi	4. 巻 1
2. 論文標題 Dupilumab Effects on Innate Lymphoid Cell and Helper T Cell Populations in Patients with Atopic Dermatitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JID Innovations	6. 最初と最後の頁 100003 ~ 100003
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xjidi.2021.100003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nakatani-Kusakabe Minori, Yasuda Koubun, Tomura Michio, Nagai Makoto, Yamanishi Kiyofumi, Kuroda Etsushi, Kanazawa Nobuo, Imai Yasutomo	4. 巻 1
2. 論文標題 Monitoring Cellular Movement with Photoconvertible Fluorescent Protein and Single-Cell RNA Sequencing Reveals Cutaneous Group 2 Innate Lymphoid Cell Subtypes, Circulating ILC2 and Skin-Resident ILC2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JID Innovations	6. 最初と最後の頁 100035 ~ 100035
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xjidi.2021.100035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Koida Atsuhide, Yasuda Koubun, Adachi Takumi, Matsushita Kazufumi, Yasuda Makoto, Hirano Shigeru, Kuroda Etsushi	4. 巻 555
2. 論文標題 Thymic stromal lymphopoietin contributes to protection of mice from Strongyloides venezuelensis infection by CD4+ T cell-dependent and -independent pathways	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 168 ~ 174
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.03.128	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Adachi Takumi, Yasuda Koubun, Muto Taichiro, Serada Satoshi, Yoshimoto Tomohiro, Ishii Ken J, Kuroda Etsushi, Araki Kimi, Ohmuraya Masaki, Naka Tetsuji, Nakanishi Kenji	4. 巻 32
2. 論文標題 Lung fibroblasts produce IL-33 in response to stimulation with retinoblastoma-binding protein 9 via production of prostaglandin E2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 637 ~ 652
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxaa031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中西憲司、足立匠、安田好文
2. 発表標題 腸管寄生虫感染時に発症する肺好酸球症の発症機構の解明と新規IL-33誘導因の発見
3. 学会等名 第85回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鯉田篤英、安田好文、足立匠、松下一史、安田誠、平野滋、黒田悦史
2. 発表標題 Thymic stromal lymphopoietinはCD4+T細胞依存性 / 非依存性の両経路を介してマウスのベネズエラ糞線虫感染防御に貢献する
3. 学会等名 第85回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Amane Mukai, Koubun Yasuda, Shiori Egashira, Takumi Adachi, Kazufumi Matsushita, Etsushi Kuroda
2. 発表標題 Induction of antigen-specific immune responses by IL-33 as a mucosal adjuvant
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 向井 周、安田 好文、江頭 志織、足立 匠、松下一史、黒田 悦史
2. 発表標題 IL-33 による粘膜アジュバント効果の作用機序解明
3. 学会等名 第25回日本ワクチン学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koubun Yasuda, Atsuhide Koida, Takumi Adachi, Kazufumi Matsushita, Etsushi Kuroda
2. 発表標題 Role of thymic stromal lymphopietin in the protection against Strongyloides venezuelensis infection
3. 学会等名 第91回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koubun Yasuda, Atsuhide Koida, Takumi Adachi, Kazufumi Matsushita, Etsushi Kuroda
2. 発表標題 Role of thymic stromal lymphopietin in the protection against Strongyloides venezuelensis infection
3. 学会等名 The 51st Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

兵庫医科大学免疫学講座 <a href="https://www.hyo-med.ac.jp/department/immunology/">https://www.hyo-med.ac.jp/department/immunology/</a> 肺好酸球症発症因子の発見 <a href="https://www.hyo-med.ac.jp/research_facilities/output/gyoseki/20200716-01.html">https://www.hyo-med.ac.jp/research_facilities/output/gyoseki/20200716-01.html</a>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	黒田 悦史  (Kuroda Etsushi)	兵庫医科大学  (34519)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	松下 一史  (Matsushita Kazufumi)	兵庫医科大学  (34519)	
研究協力者	足立 匠  (Adachi Takumi)	兵庫医科大学  (34519)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関